Mycopathologia et Mycologia applicata, vol. 54, 4, pag. 435–437, 1974

AISLAMIENTO DE ANTIGENOS CATIONICOS DE PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS MEDIANTE INTERCAMBIO IONICO

par

A. Nieto[1], J. A. Coch[1], J. M. Torres[2] & L. A. Yarzábal[2, 3]

Resumen

El procedimiento de intercambio iónico empleado en este trabajo ha mostrado ser un método eficiente, sencillo y rápido, para eliminar las fracciones antigénicas aniónicas de un extracto 'crudo' de *P. brasiliensis*.

Su empleo permitió la obtención de un antígeno 'purificado' que contiene algunas de las fracciones catiónicas del extracto 'crudo'. El antígeno responsable de la formación del arco E fue identificado en el extracto 'purificado', mediante análisis inmunoelectroforético.

Trabajos anteriores (1, 2, 3, 5) han mostrado que los extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis* poseen numerosas fracciones capaces de provocar la formación de anticuerpos precipitantes, tanto en animales inmunizados o infectados experimentalmente, como en humanos afectados por paracoccidiodomicosis.

El análisis inmunoelectroforético de esos extractos por medio de sueros hiperinmunes preparados en conejos, ha revelado 25 de los componentes antigénicos del hongo, 15 de los cuales poseen actividad enzimática (6, 7).

Una de esas fracciones participa en la formación del sistema precipitante denominado arco E, que hasta el momento actual es considerado específico de la paracoccidioidomicosis (5). Este antígeno (fracción E) sólo ha sido demostrado en *P. brasiliensis*, caracterizándose por movilizarse hacia el cátodo cuando se le somete a electroforesis en agar a pH 8.2, y por poseer la actividad enzimática fosfatasa alcalina (6, 7).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, hemos considerado que el aislamiento de la fracción E podría facilitar un estudio más completo de su estructura química y de su inmunogenicidad. Por otra parte, se obtendría así un antígeno altamente específico para el inmunodiagnóstico de la paracoccidioidomicosis.

[1] Cátedra de Físico-Química, Facultad de Química y Farmacia, Montevideo, Uruguay.
[2] Laboratorio de Inmunología Parasitaria, Facultad de Medicina, Casilla de Correo 1737, Montevideo, Uruguay.
[3] Dirección actual: Instituto Bacteriológico de Chile, Av. Marathon 1000, Casilla 48, Santiago, Chile.
Accepted for publication: 29.IX.1973.

Por estas razones se ha intentado su separación a partir de un extracto metabólico 'crudo' de *P. brasiliensis*, procurando, en una primera etapa, la 'purificación' de este antígeno mediante extracción, por intercambio iónico de sus fracciones menos específicas.

La comunicación de los resultados primarios obtenidos séra el objetivo fundamental de este artículo.

Materiales y método

(*A*) *Antígeno 'crudo'*

Se empleó como tal un extracto metabólico de la fase filamentosa de *P. brasiliensis* (cepas IHM[1] 891, IHM 1437, IHM 1572, LIP[2] 70.159) obtenido con la técnica recomendada por Yarzábal (5).

(*B*) *Purificación*

Para evitar la etapa de desorción se prefirió utilizar un intercambiador aniónico. Se hidrató 0.6 g de Sephadex DEAE A-50, con 25 ml de tampón Tris HCl (pH 8.2, 0.1 M), durante 18 horas. Con el material resultante se preparó una columna de 20 ml, que se lavó con 25 ml de tampón[3]. Posteriormente se adicionó una solución de 100 mg de antígeno 'crudo' en 1 ml de tampón, eluyéndose a continuación con 25 ml del mismo 'buffer'. El eluído se dializó contra 5 lt de agua destilada, con cambios diarios a 5 °C de temperatura ambiente, durante 4 días. Después de la diálisis se controló la conductividad del preparado.

(*C*) *Análisis immunoelectroforético*

Se practicó mediante suero hiperinmune anti extracto metabólico 'crudo' de *P. brasiliensis*, preparado en conejo según el procedimiento de Andrieu et al. (1). Se utilizó la microtécnica de inmunoelectroforesis propuesta por Scheiddeger (4), usando agarosa como soporte. El antigeno 'purificado' se empleó a una concentración de 10 mg/ml.

Resultados

Durante la cromotografía la columna retuvo en su tercio superior una sustancia de color marrón. El producto eluído, una vez dializado, presentó una conductividad igual a la del agua destilada. Después de

[1] Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

[2] Laboratorio de Inmunología Parasitaria, Facultad de Medicina, Casilla de Correo 1737, Montevideo, Uruguay.

[3] Los cálculos fueron hechos en base a las sugerencias de los fabricantes: 'Sephadex Ion exchangers. A guide to ion exchange chromatography'. Pharmacia UppSala, 1970.

liofilización se redujo a 5 mg de polvo blanco, higroscópico, que constituyó el antígeno 'purificado'. El análisis inmunoelectroforético de éste demostró que la cromatografía eliminó los componentes aniónicos inicialmente existentes en el antígeno 'crudo' (fig. 1).

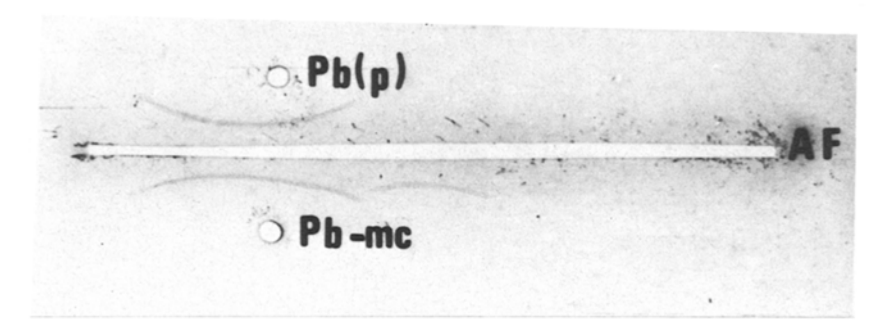


Fig. 1. Análisis immunoelectroforético del antígeno 'purificado' (Pbp), y del antígeno metabólico 'crudo' (Pbmc) de P. brasiliensis, mediante suero hiperinmune de conejo anti-antígeno 'crudo'. Se observa que el antígeno 'purificado' conserva 3 de las fracciones catiónicas del extracto 'crudo'. El arco más nítido corresponde a la fracción E.

El antigeno 'purificado' contiene, en cambio, tres de las fracciones antigénicas catiónicas, incluyendo la fracción E.

Referencias

1. Andrieu, S., J. Biguet, L. Dujardin & T. Vaucelle (1969) Etude antigénique des agents des mycoses profondes par l'analyse comparée des millieux de culture. I. Histoplasma capsulatum et H. duboisii. Relations avec H. farciminosum, Gymnoascus demonbreunii, Blastomyces dermatitidis et Paracoccidioides brasiliensis. Mycopath. Mycol. Appl., 39: 97–108.
2. Restrepo, E. (1970) Serological comparison of the two morphological phases of Paracoccidioides brasiliensis. Infec. Immun., 2: 268–273.
3. Restrepo, A. & E. Drouhet (1970) Etude des anticorps précipitants dans la blastomycose Sud-Américaine par l'analyse immunoélectrophorétique des antigénes de P. brasiliensis. Ann. Inst. Pasteur (Paris), 119: 338–346.
4. Scheidegger, J. J. (1955) Une micro-méthode de l'immunoélectrophorese. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7: 103– .
5. Yarzábal, L. A. (1971) Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicosis sudamericana revelados por inmunoelectroforesis. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo, 13: 320–327.
6. Yarzábal, L. A., J. M. Torres, I. Vigna, S. Da Luz & S. Andrieu (1971) Mosaico antigénico de Paracoccidioides brasiliensis. Primer Simposio Panamericano sobre Paracoccidioidomicosis. OPS/OMS, Medellín, (Colombia), 25–27 de octubre.
7. Yarzábal, L. A., J. Biguet, T. Vaucelle, S. Andrieu, J. M. Torres & S. Da Luz (1973) Análisis immunoquimico de extractos solubles de Paracoccidioides brasiliensis. Sabouraudia, 11: 80–88.